



*Azienda Ospedaliera Nazionale  
SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo  
Alessandria*

# **Working Paper of Public Health**

## **Nr. 09/2015**



La serie di *Working Paper of Public Health* (WP) dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria è una serie di pubblicazioni *online* ed *Open Access*, *progressiva* e *multi disciplinare* in *Public Health* (ISSN: 2279-9761). Vi rientrano pertanto sia contributi di medicina ed epidemiologia, sia contributi di economia sanitaria e management, etica e diritto. Rientra nella politica aziendale tutto quello che può proteggere e migliorare la salute della comunità attraverso l'educazione e la promozione di stili di vita, così come la prevenzione di malattie ed infezioni, nonché il miglioramento dell'assistenza (sia medica sia infermieristica) e della cura del paziente. Si prefigge quindi l'obiettivo scientifico di migliorare lo stato di salute degli individui e/o pazienti, sia attraverso la prevenzione di quanto potrebbe condizionarla sia mediante l'assistenza medica e/o infermieristica finalizzata al ripristino della stessa.

Gli articoli pubblicati impegnano esclusivamente gli autori, le opinioni espresse non implicano alcuna responsabilità da parte dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria.

La pubblicazione è presente in: [Directory of Open Access Journals \(DOAJ\)](#); [Google Scholar](#); [Academic Journals Database](#);

#### Comitato Scientifico:

Dr. Ivo Casagrande  
Dr. Gabriele Ferretti  
Dr.ssa Lorella Gambarini  
Dr. Francesco Musante  
Dr. Claudio Pesce  
Dr. Fernando Pesce  
Dr. Salvatore Petrozzino

#### Comitato di Direzione:

Dr. Antonio Maconi  
Dr. Ennio Piantato

#### Responsabile:

Dr. Antonio Maconi  
telefono: +39.0131.206818  
email: [amaconi@ospedale.al.it](mailto:amaconi@ospedale.al.it)

#### Segreteria:

Roberto Ippoliti, Ph.D.  
telefono: +39.0131.206819  
email: [rippoliti@ospedale.al.it](mailto:rippoliti@ospedale.al.it)

#### Norme editoriali:

Le pubblicazioni potranno essere sia in lingua italiana sia in lingua inglese, a discrezione dell'autore. Sarà garantita la sottomissione di manoscritti a tutti coloro che desiderano pubblicare un proprio lavoro scientifico nella serie di WP dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria, purché rientrino nelle linee guida editoriali. Il Responsabile Scientifico di redazione verificherà che gli articoli sottomessi rispondano ai criteri editoriali richiesti. Nel caso in cui lo si ritenga necessario, lo stesso Responsabile valuterà l'opportunità o meno di una revisione a studiosi o ad altri esperti, che potrebbero o meno aver già espresso la loro disponibilità ad essere revisori per il WP (i.e. *peer review*). L'utilizzo del *peer review* costringerà gli autori ad adeguarsi ai migliori *standard* di qualità della loro disciplina, così come ai requisiti specifici del WP. Con questo approccio, si sottopone il lavoro o le idee di

un autore allo scrutinio di uno o più esperti del medesimo settore. Ognuno di questi esperti fornirà una propria valutazione, includendo anche suggerimenti per l'eventuale miglioramento, all'autore, così come una raccomandazione esplicita al Responsabile Scientifico su cosa fare del manoscritto (i.e. *accepted* o *rejected*).

Al fine di rispettare criteri di scientificità nel lavoro proposto, la revisione sarà anonima, così come l'articolo revisionato (i.e. *double blinded*).

#### Diritto di critica:

Eventuali osservazioni e suggerimenti a quanto pubblicato, dopo opportuna valutazione di attinenza, sarà trasmessa agli autori e pubblicata *on line* in apposita sezione ad essa dedicata.

Questa iniziativa assume importanza nel confronto scientifico poiché stimola la dialettica e arricchisce il dibattito su temi d'interesse. Ciascun professionista avrà il diritto di sostenere, con argomentazioni, la validità delle proprie osservazioni rispetto ai lavori pubblicati sui Working Paper of Public Health.

Nel dettaglio, le norme a cui gli autori devono attenersi sono le seguenti:

- I manoscritti devono essere inviati alla Segreteria esclusivamente in formato elettronico all'indirizzo e-mail dedicato (i.e. [rippoliti@ospedale.al.it](mailto:rippoliti@ospedale.al.it));
- A discrezione degli autori, gli articoli possono essere in lingua italiana o inglese. Nel caso in cui il manoscritto è in lingua italiana, è possibile accompagnare il testo con due riassunti: uno in inglese ed uno in italiano, così come il titolo;
- Ogni articolo deve indicare, se applicabile, i codici di classificazione JEL (scaricabili al sito: [http://www.econlit.org/subject\\_descriptors.html](http://www.econlit.org/subject_descriptors.html)) e le Keywords, nonché il tipo di articolo (i.e. Original Articles, Brief Reports oppure Research Reviews);
- L'abstract è il riassunto dell'articolo proposto, pertanto dovrà indicare chiaramente: Obiettivi; Metodologia; Risultati; Conclusioni;
- Gli articoli dovrebbero rispettare i seguenti formati: *Original Articles* (4000 parole max., abstract 180 parole max., 40 references max.); *Brief Reports* (2000 parole max., abstract 120 parole max., 20 references max., 2 tabelle o figure) oppure *Research Reviews* (3500-5000 parole, fino a 60 references e 6 tabelle e figure);
- I testi vanno inviati in formato Word (Times New Roman, 12, interlinea 1.5). Le note, che vanno battute in apice, non possono contenere esclusivamente riferimenti bibliografici. Inoltre, la numerazione deve essere progressiva;
- I riferimenti bibliografici vanno inseriti nel testo riportando il cognome dell'Autore e l'anno di pubblicazione (e.g. Calabresi, 1969). Nel caso di più Autori, indicare nel testo il cognome del primo aggiungendo *et al*; tutti gli altri Autori verranno citati nei riferimenti bibliografici alla fine del testo.
- I riferimenti bibliografici vanno elencati alla fine del testo in ordine alfabetico (e cronologico per più opere dello stesso Autore).

Nel sottomettere un manoscritto alla segreteria di redazione, l'autore accetta tutte le norme qui indicate.



*Titolo:* Monitoraggio terapeutico del levetiracetam (Keppra®): confronto tra un nuovo metodo immunologico e il metodo di riferimento in cromatografia liquida ad alta prestazione.

*Autori:* Bianchi, V.;\*<sup>1</sup>, Martino, F.;<sup>1</sup> Piccinini, S.;<sup>1</sup> Pinca, A.;<sup>1</sup> Sida, G.;<sup>1</sup> Riva, F.<sup>2</sup>

*Tipo:* Articolo Originale

*Parole chiave:* Levetiracetam; HPLC; confronto tra metodi; saggio immunometrico;

---

<sup>1</sup> Laboratorio di Riferimento Regionale di Tossicologia  
SC Laboratorio Analisi  
Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo  
Tel +39 0131 206214

\*Autore per la corrispondenza: [vbianchi@ospedale.al.it](mailto:vbianchi@ospedale.al.it)

<sup>2</sup> S.S.A. Sviluppo e Promozione Scientifica  
Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo  
Tel +39 0131 206720



## ABSTRACT

*Obiettivi:* Il monitoraggio terapeutico levetiracetam, nuovo farmaco anti-convulsivante può essere indicato in pazienti le cui condizioni potrebbero alterare le caratteristiche farmacocinetiche, nella personalizzazione della singola posologia e nella valutazione della compliance del paziente. In questo studio, per il dosaggio del levetiracetam viene confrontato il metodo validato Bio-Rad HPLC attualmente in uso con il metodo ARK<sup>TM</sup> immunologico con strumenti statistici avanzati.

*Metodi:* Le concentrazioni di levetiracetam di 63 campioni sono stati determinati utilizzando:  
1) "Levetiracetam mediante HPLC" kit da Bio-Rad (Hercules, CA) sul sistema HPLC Agilent 1100 e 2) immunologico "ARK<sup>TM</sup> Levetiracetam" di ARK Diagnostics Inc. (Fremont, CA) sulla piattaforma CDx90 da Thermo Fisher Scientific Inc.

*Risultati:* L'imprecisione e il bias intra-laboratorio del nuovo metodo, valutati su un periodo di 20 giorni, sono stati rispettivamente 7,4% e 0,5% a 7,5 µg/mL, 4,5% e 1,9% a 30 µg/mL, 3,1% e 2,0% a 75 µg /mL. Analisi di regressione Passign-Bablok (X: Bio-Rad, Y: Ark) ha mostrato una intercetta non significativo di 0,16 (95% CI -0.55-0.72) e una pendenza marginalmente significativa di 0,95 (95% CI ,90-0,99) che suggerisce un minimo errore sistematico proporzionale. Anche l'analisi Bland-Altman ha mostrato un minimo bias sistematico di 1,0 mg/mL (95% CI 0,32-1,69) con il 95% delle differenze HPLC-Ark vanno da -4.3 (95% CI -5,52 - (-) 3.16) e 6,3 (95% CI 5,16-7,52). I dati hanno mostrato che i valori ottenuti dai due metodi sono da considerarsi identici sia entro l'imprecisione intrinseca così come per le specifiche di qualità analitiche (errore massimo ammissibile il 15%).

*Conclusioni:* Il nuovo metodo ARK<sup>TM</sup> sulla piattaforma CDx è accettabile e può essere utilizzato per misurare la concentrazione di routine levetiracetam. In particolare, poiché il metodo immunologico abbassa drasticamente il TAT è più facile ed immediato l'aggiustamento della posologia nei pazienti critici.



## ABSTRACT

*Background and aims:* Therapeutic drug monitoring of the anti-convulsant levetiracetam may be indicated in patients with conditions that may alter pharmacokinetic characteristics, for tailoring individual dosage regimens or to investigate patient's compliance. In this study, using advanced statistical tools, we compared the in-use and validated Bio-Rad HPLC method with the ARKTM immunoassay method for levetiracetam monitoring.

*Method:* Levetiracetam concentrations of 63 samples were determined using: 1) "Levetiracetam by HPLC" kit by Bio-Rad (Hercules, CA) on the Agilent 1100 HPLC system and 2) "ARKTM Levetiracetam" immunoassay by ARK Diagnostics Inc. (Fremont, CA) on the CDx90 platform by Thermo Fisher Scientific Inc.

*Results:* Within-laboratory imprecision and bias of the new method, evaluated over a 20 day period, were respectively 7.4% and 0.5% at 7.5 µg/mL, 4.5% and 1.9% at 30 µg/mL, 3.1% and 2.0% at 75 µg/mL. Passign-Bablok regression analysis (X:Bio-Rad; Y:Ark) showed a non significant intercept of 0.16 (95%CI -0.55-0.72) and a slope marginally significant of 0.95 (95%CI 0.90-0.99) which suggested minimum proportional systematic error. In agreement, Bland-Altman analysis showed minimum systematic bias of 1.0 µg/ml (95%CI 0.32-1.69) with 95% of the HPLC–Ark differences ranging from -4.3 (95%CI -5.52-(-)3.16) and 6.3 (95%CI 5.16-7.52). Our data showed that the two methods were identical both within inherent imprecision as well as analytical quality specifications (maximum allowable error 15%).

*Conclusions:* The new Ark method on the CDx platform is acceptable and may be used to routinely measure levetiracetam concentration. In particular, the adjustment of the medical treatment is easier because results are more available in terms of time.

## 1. Introduzione

### 1.1 Caratteristiche del levetiracetam

Il Levetiracetam (Keppra®), una (S)- $\alpha$  etil-2-oxo-1-pirridolina acetammide con PM di 170,2 uma, strutturalmente simile al piracetam, è un farmaco antiepilettico utilizzabile come monoterapia in caso di crisi parziali, o come terapia aggiuntiva per convulsioni miocloniche e tonico-cloniche [1] (Figura 1).

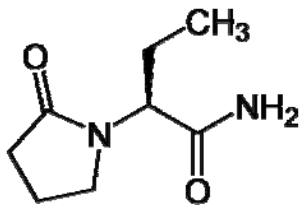


Figura 1: struttura chimica del levetiracetam.

Il Levetiracetam mostra sia un eccellente assorbimento orale che un'ottima biodisponibilità (>95%), con una emivita plasmatica di 6-8 ore nei soggetti sani. Non è legato alle proteine plasmatiche e non viene metabolizzato a livello del fegato, ma è eliminato per via renale; nelle urine è presente per il 66% come farmaco invariato e per il 24% come metabolita primario che risulta farmacologicamente inattivo [2]. Grazie alle sue caratteristiche farmacocinetiche molto favorevoli e alla sua tollerabilità, l'uso clinico di levetiracetam non presenta particolari complessità [2-3]. Tuttavia, il monitoraggio terapeutico del levetiracetam può essere indicato nei pazienti con condizioni che possono alterare le caratteristiche farmacocinetiche (anziani, bambini, donne in gravidanza o pazienti con insufficienza renale), al fine di adeguare il dosaggio allo specifico paziente e/o per eventualmente indagarne la compliance [4]. Negli anziani, nei quali l'emivita del farmaco è aumentata di circa il 40% (10-11 ore) a causa della ridotta funzionalità renale, e nei pazienti con insufficienza renale, nei quali la clearance del levetiracetam è correlata alla clearance della creatinina, la dose giornaliera di mantenimento del levetiracetam deve essere attentamente regolata ed il monitoraggio terapeutico del farmaco è fortemente consigliato [5]. Tuttavia non sono

riportati in letteratura range terapeutici specifici né in pazienti pediatrici né in pazienti adulti con funzionalità renale ridotta o compromessa.

### 1.2 Monitoraggio terapeutico del levetiracetam

Attualmente sono disponibili differenti metodi analitici per il monitoraggio terapeutico del levetiracetam, tra i quali metodi cromatografici con rivelatore UV o DAD o con spettrometro di massa (LC-MS/MS) [6-8]. Tuttavia, questi metodi richiedono una preparazione manuale del campione, personale altamente qualificato e/o strumentazioni costose. Inoltre, in considerazione dell'elevato carico di lavoro, solitamente il dosaggio di questo farmaco, eseguito con metodica cromatografica, è limitato a uno o due giorni alla settimana.

Le richieste di dosaggio di antiepilettici di nuova generazione sono in continuo aumento. In particolare, per il solo levetiracetam le determinazioni effettuate nel Laboratorio Analisi dell'Azienda ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo di Alesandria sono aumentate da 179 nel 2011 a 974 nel 2014 (Figura 2).

Anno	Richieste levetiracetam
2011	179
2012	426
2013	606
2014	974

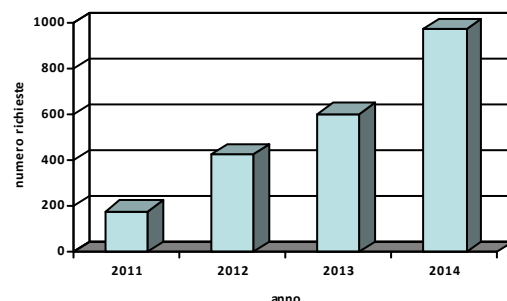


Figura 2: andamento temporale (periodo 2011-2014) delle richieste di levetiracetam pervenute al Laboratorio Analisi.

L'implementazione di un test immunometrico per il dosaggio del levetiracetam con strumentazione automatica può presentare diversi vantaggi rispetto ai metodi cromatografici, tra i quali la semplificazione della fase preparativa e la riduzione del tempo necessario per la preparazione e processazione del campione, con potenziali miglioramenti nella cura del paziente e/o riduzione dei costi. Inoltre, l'utilizzo di una strumentazione automatica consente, da un lato, di effettuare il monitoraggio del farmaco tutti i giorni, festivi compresi,

condizione particolarmente vantaggiosa nei pazienti critici, e, dall'altro, di ottimizzare le risorse (tempo e personale) del laboratorio.

### 1.2.1 Piattaforma analitica CDx90

Recentemente ThermoFisher ha sviluppato una nuova piattaforma analitica, distribuita nel mercato italiano da Tema Ricerca. L'analizzatore CDx90 (Figura 3) è uno strumento compatto da banco completamente automatizzato, con accesso random, sviluppato appositamente per i laboratori dedicati al monitoraggio di farmaci e droghe d'abuso. Con una cadenza analitica di 90 test per ora, la possibilità di gestire campioni in urgenza, la presenza di un lettore di barcode esterno e di un'interfaccia per l'utente tramite schermo touch screen, con l'ampia gamma di analiti misurabili e le dimensioni contenute, questo strumento sembra coniugare perfettamente elevate prestazioni e facilità di utilizzo.



Figura 3: analizzatore automatico da banco CDx90 (ThermoFisher)

Tuttavia, per sostituire un metodo analitico già utilizzato in laboratorio con un nuovo metodo è necessario che l'operatore conduca una serie di esperimenti atti a valutare se il nuovo metodo può eventualmente sostituire quello attualmente in uso, consentendo uguali o migliori prestazioni analitiche, senza compromettere il significato e l'impatto clinico del dato prodotto [9].

### 1.3 Scopo del lavoro

Un numero crescente di pubblicazioni ha evidenziato come molti studi di comparazione tra metodi analitici siano stati condotti in modo non corretto, relativamente sia alla fase del disegno sperimentale, dell'analisi statistica e dell'interpretazione dei dati [10-13].





Questo lavoro si propone, attraverso l'utilizzo di strumenti statistici e grafici come la regressione di Passing-Bablok [14], il grafico di Bland-Altman [13, 15] ed il grafico MEDx [16], di confrontare il metodo HPLC (Bio-Rad) attualmente utilizzato in laboratorio con il metodo ARK implementato su piattaforma CDx90, al fine di valutarne l'accettabilità.

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 Pazienti e campioni

Per questo studio sono stati arruolati 63 pazienti, non selezionati, con una richiesta del medico di base o di un Servizio Ospedaliero per monitoraggio terapeutico del levetiracetam. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette di plastica da siero (Becton Dickinson Vacutainer). Dopo centrifugazione, i campioni sono stati suddivisi in due aliquote e successivamente analizzati con entrambi i metodi. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida del Comitato Etico locale in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki.

### 2.2 Metodi e strumentazioni

La concentrazione di Levetiracetam dei campioni è stata determinata utilizzando due metodi:

- 1) kit "Levetiracetam by HPLC" della ditta Bio-Rad (Hercules, CA) implementato su strumentazione HPLC Agilent 1100 con software ChemStation CDM Rev. B. 03.01 (da ora identificato come "*metodo in uso*");
- 2) immunodosaggio "ARK™ Levetiracetam" della ditta ARK Diagnostic Inc. (Fremont, CA) implementato su strumentazione CDx90 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA), distribuita in Italia da Tema Ricerca Srl (Castenaso, BO) (da ora identificato come "*metodo in prova*").

#### 2.2.1 Principio analitico del metodo in uso "Levetiracetam by HPLC"

Per il metodo in uso in HPLC, 100  $\mu$ L di siero (campione, calibratore o controllo) sono stati miscelati con 400  $\mu$ L di una soluzione di lavoro contenente lo standard interno. Dopo centrifugazione, 50  $\mu$ L di surnatante sono stati iniettati nella colonna HPLC (eluizione isocratica; colonna a fase inversa 150x4 mm DI; flusso: 0,8 mL/min; temperatura della

colonna: 40°C; assorbanza: 210 nm; durata corsa: 15 min, intervallo di linearità: 0,5-200 µg/mL).

### 2.2.2 Principio analitico del metodo in prova " ARK™ Levetiracetam"

Nel metodo in prova "ARK™ Levetiracetam", il levetiracetam contenuto nel campione compete per il legame con l'anticorpo con il levetiracetam marcato con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) aggiunto al campione. Se la molecola marcata si lega all'anticorpo, l'attività dell'enzima diminuisce. Se nel campione è presente invece levetiracetam, l'attività enzimatica aumenta in modo direttamente proporzionale alla concentrazione del farmaco. L'enzima attivo converte il coenzima nicotinamide adenin-dinucleotide (NAD) in NADH, misurato spettrofotometricamente come variazione dell'assorbanza a 340 nm. Il metodo in prova è stato implementato sullo strumento automatizzato CDx90 con accesso casuale (90 test/ora).

Il dosaggio è stato calibrato utilizzando 6 concentrazioni fornite da ARK Diagnostics (0, 5,12,5, 25,0, 50,0 e 100 µg/mL). In breve, 2,5 µL di siero (campione, calibratore o controllo) sono stati miscelati con 150 µL di soluzione contenente l'anticorpo e 75 µL di soluzione contenente l'enzima coniugato (levetiracetam marcato con G6PDH). Il NADH formato è stato misurato spettrofotometricamente come variazione dell'assorbanza a 340 nm (intervallo di linearità: 2,0-100 µg/mL).

Tutti i test (metodo in uso o metodo in prova) sono stati effettuati in accordo alle istruzioni operative fornite dal Produttore, su strumentazioni (HPLC e CDx90) già presenti in Laboratorio, utilizzate in routine da personale tecnico altamente specializzato. Il range terapeutico utilizzato per il levetiracetam è: 5-30 µg/mL.

### 2.3 Verifica delle prestazioni

Entrambi i metodi utilizzati in questo studio sono stati studiati e validati estensivamente in precedenti studi [17]. Tuttavia, prima di iniziare questo esperimento di comparazione tra metodi analitici, le prestazioni analitiche dichiarate dal Produttore sono state verificate. Campioni di controllo acquistati dall'industria, con livelli di concentrazione differenti (7,5, 30 e 75 µg/mL), sono stati analizzati in ogni batch analitico. Lo studio della precisione (totale o entro il laboratorio), utile al fine di valutare l'imprecisione combinata dei metodi, è stato condotto per un periodo non inferiore a 20 giorni [18-19].

## 2.4 *Analisi Statistica*

Tutte le analisi statistiche e i grafici sono stati eseguiti utilizzando i software statistici SPSS software v. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e MedCalc v 9.6.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgio).

I metodi analitici sono stati comparati tramite il grafico di Bland-Altman [13, 15] e la regressione non parametrica di Passing-Bablok [14]. L'accettabilità del metodo in prova è stata valutata seguendo due approcci: l'accettabilità entro l'imprecisione intrinseca e l'accettabilità basata su specifiche o livelli di qualità fissate a priori.

### 2.4.1 *Accettabilità entro l'imprecisione intrinseca*

Per valutare l'accettabilità entro l'imprecisione intrinseca, l'imprecisione combinata dei due metodi è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$CV = \sqrt{CV_{method1}^2 + CV_{method2}^2}$$

dove  $CV_{method1}$  e  $CV_{method2}$  rappresentano rispettivamente le imprecisioni del metodo in uso e del metodo in prova. Due linee, corrispondenti a  $0 \pm 1,96$  volte l'imprecisione combinata, sono state aggiunte al grafico in cui le differenze tra i metodi sono state graficate verso la concentrazione di levetiracetam [20].

### 2.4.2 *Accettabilità basata su specifiche di qualità fissate a priori*

L'accettabilità basata su specifiche di qualità fissate a priori è stata valutata utilizzando un errore totale massimo ammissibile (TE<sub>max</sub>) del 15% [21] ed il grafico MEDx [16], in cui vengono confrontati inaccuratezza e imprecisione dei due metodi [20]. L'errore totale massimo ammissibile pari al 15% è stato scelto considerando errori totali massimi riportati per farmaci simili nella letteratura scientifica [21].

Nel grafico MEDx, proposto da Westgard, sono presenti 3 linee, che rappresentano rispettivamente 3 diversi criteri attualmente accettati per l'Errore Totale (TE<sub>max</sub>). Queste linee sono tracciate collegando l'errore totale (TE<sub>max</sub>) sull'asse delle ordinate (asse y) con 3 differenti punti dell'asse delle ascisse (asse x):

- 1)  $TE_{max}/2 = 7,5\%$  (corrispondente al criterio di errore totale  $TE_{max} = \text{Inaccuratezza} + 2$  volte l'Imprecisione);
- 2)  $TE_{max}/3 = 5\%$  (corrispondente al criterio di errore totale  $TE_{max} = \text{Inaccuratezza} + 3$  volte l'Imprecisione);



3)  $TE_{max}/4 = 3,75\%$  (corrispondente al criterio errore totale  $TE_{max} = \text{Inaccuratezza} + 4$  volte l'Imprecisione).

Le tre linee suddividono l'area del grafico in 4 zone corrispondenti a diverse specifiche di qualità: dall'origine degli assi verso l'esterno esse sono "non accettabile", "marginale", "buona" e "ottima".

Nel grafico MEDx viene inoltre tracciato un punto avente come coordinate x e y rispettivamente l'imprecisione e l'inaccuratezza del metodo in prova, calcolate al limite superiore del range di riferimento ( $30 \mu\text{g/mL}$ ) utilizzando i dati sperimentali della verifica della precisione e dell'equazione di regressione di Passing-Bablok.

#### *2.4.3 Valutazione dell'accordo con variabili qualitative*

Per valutare ulteriormente l'accordo tra il metodo automatizzato (in prova) e HPLC (in uso), le concentrazioni di levetiracetam, espresse come variabile quantitativa continua, sono state trasformate ed espresse come variabile qualitativa dicotomica (normale:  $<30 \mu\text{g/mL}$ ; elevato:  $>30 \mu\text{g/mL}$ ). La concordanza tra i due metodi, dopo trasformazione, è stata valutata come percentuale (%) di coppie doppie positive o doppie negative e tramite coefficiente pesato k di Cohen con intervallo di confidenza al 95%.

### **3. Risultati**

#### *3.1 Verifica delle prestazioni analitiche*

Le concentrazioni di levetiracetam di campioni commerciali di controllo sono risultate, in ogni batch analitico, entro l'intervallo dichiarato dal produttore per entrambi i metodi indagati.

In particolare, l'imprecisione entro il laboratorio (imprecisione totale) e l'inaccuratezza del nuovo metodo, valutate lungo un periodo di 20 giorni, erano rispettivamente pari a 7,4% e 0,5% a  $7,5 \mu\text{g/mL}$ , 4,5% e 1,9% a  $30 \mu\text{g/mL}$ , 3,1% e 2,0% a  $75 \mu\text{g/mL}$ .

#### *3.2 Esperimento di comparazione dei due metodi analitici*

Le concentrazioni di levetiracetam misurate con i metodi HPLC e ARK sono state rispettivamente (mediana, range interquartile, min-max):  $18,8 \mu\text{g/mL}$  (10,3-32,2, 0,0-88,0) e  $17,5 \mu\text{g/mL}$  (9,6-30,9, 1,0-81,0).

I metodi sono stati confrontati utilizzando la regressione non parametrica di Passing-Bablok, che fornisce coefficiente angolare (con intervallo di confidenza al 95%), stima dell'errore sistematico proporzionale, e intercetta (con intervallo di confidenza al 95%), stima dell'errore sistematico costante, e con l'analisi di Bland-Altman, che fornisce la differenza media (con intervallo di confidenza al 95%), stima dell'errore sistematico, e l'intervallo che comprende il 95% delle differenze osservate tra i due metodi.

L'analisi di regressione (X: Bio-Rad HPLC, Y: ARK) ha mostrato un'intercetta non significativa di 0,16 (95% IC -0,55-0,72) e un coefficiente angolare marginalmente significativo di 0,95 (95% IC 0,90-0,99), che suggerisce la presenza di un minimo errore proporzionale (Figura 4).

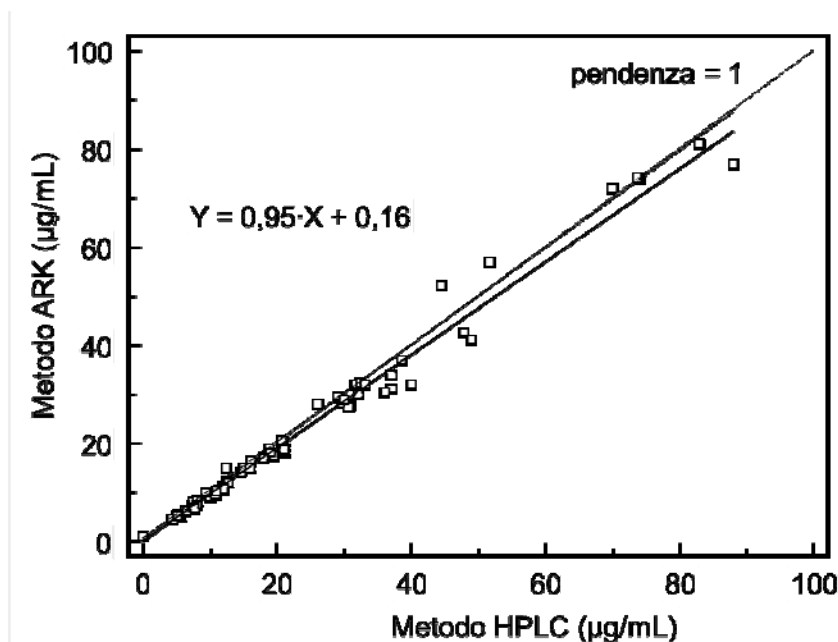


Figura 4: Regressione non parametrica di Passing-Bablok per il confronto tra i metodi HPLC Bio-Rad (asse X) e ARK (asse Y). Nel grafico è possibile osservare la linea di identità (pendenza=1), la linea di regressione (linea continua) con l'intervallo di confidenza al 95% (linee tratteggiate).

Similmente, l'analisi di Bland-Altman ha mostrato un minimo errore sistematico di 1,0 µg/mL (95%IC 0,32-1,69) con il 95% delle differenze HPLC-ARK comprese nell'intervallo da -4,3 (95%IC -5,52-(-)3.16 a 6,3 (95%IC 5,16-7,52) (Figura 5).

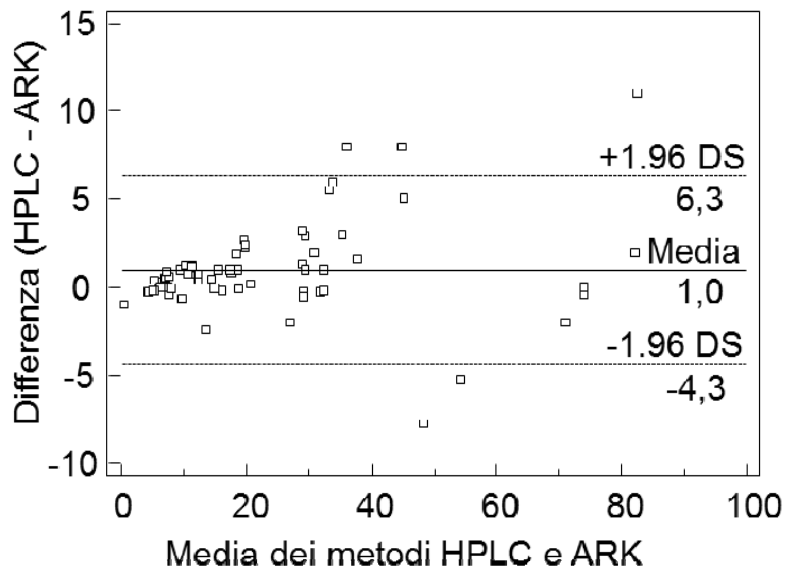


Figura 5: Analisi di Bland-Altman per il confronto tra i metodi HPLC Bio-Rad. La media delle concentrazioni di levetiracetam ottenute con i due metodi (asse X) sono graficate contro le loro differenze (asse Y). Nel grafico è possibile osservare la linea continua indicante la differenza media tra i due metodi (1,0 µg/mL) e le due linee delimitanti l'intervallo contenente il 95% delle differenze osservate (limiti di accordo al 95%) (linee tratteggiate).

### 3.3 Valutazione dell'accettabilità secondo l'imprecisione intrinseca

Sulla base dell'imprecisione misurata di entrambi i metodi, rispettivamente pari a 4,0% e 4,5% per Bio-Rad HPLC e ARK, l'imprecisione intrinseca combinata (CV%) è risultata pari a  $CV = (4,0^2 + 4,5^2)^{1/2} = 6\%$ . Questo valore indica che se i due metodi fossero identici, le differenze fra i valori misurati con un metodo e con l'altro sarebbero distribuite simmetricamente intorno a 0 µg/mL, e il 95% di queste differenze dovrebbero essere comprese nell'intervallo  $0 \pm 1,96 \text{ volte } 6\% = 0 \pm 11,8\%$ . Ad un livello di 30 µg/mL ad esempio, la differenza tra i due metodi dovrebbe essere compresa nell'intervallo da -3,5 a 3,5 µg/mL. I dati sperimentali hanno evidenziato che il metodo ARK era sostanzialmente sovrapponibile al metodo HPLC relativamente all'imprecisione intrinseca, e quindi accettabile. Infatti, l'81% (percentuale attesa: 95%) delle differenze HPLC-ARK erano all'interno dell'intervallo  $0 \pm 1,96$  volte il coefficiente di variazione intrinseca combinato di entrambi i metodi (Figura 6).

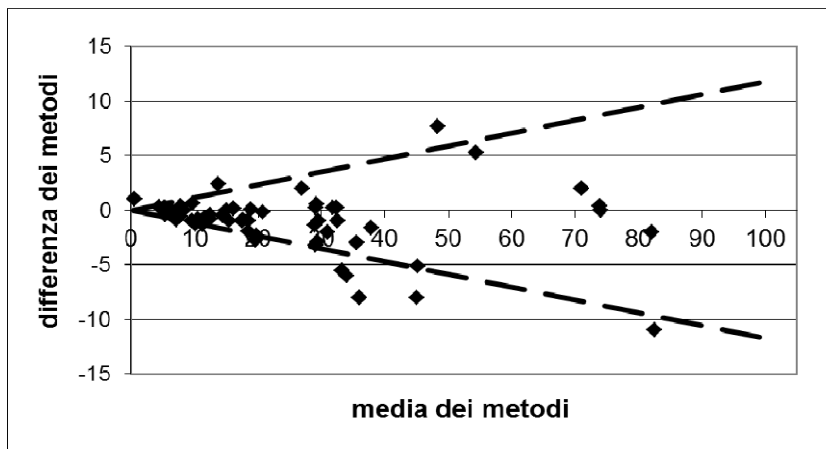


Figura 6: Grafico delle differenze. Le linee tratteggiate rappresentano l'intervallo compreso tra  $0 \pm 1,96$  volte la precisione intrinseca combinata (CV%) dei metodi HPLC e ARK (6%), ovvero l'intervallo entro cui dovrebbe trovarsi il 95% delle differenze tra i due metodi se questi fossero identici entro la precisione intrinseca (se cioè le loro differenze differissero a meno della loro precisione). A titolo esemplificativo: a  $5 \mu\text{g/mL}$  l'intervallo va da  $0 \pm 1,96 \cdot 6\% \cdot 5 = -0,59$  a  $+0,59$ ; a  $30 \mu\text{g/mL}$  l'intervallo va da  $0 \pm 1,96 \cdot 6\% \cdot 30 = -3,53$  a  $+3,53$ ; a  $75 \mu\text{g/mL}$  l'intervallo va da  $0 \pm 1,96 \cdot 6\% \cdot 75 = -8,82$  a  $+8,82$ .

### 3.4 Valutazione dell'accettabilità basata su specifiche di qualità

Utilizzando il coefficiente angolare (0,95) e l'intercetta (0,16) ottenuti dall'analisi di regressione di Passing-Bablok, il valore previsto per una concentrazione target di levetiracetam di  $30 \mu\text{g/mL}$  (limite superiore del range di riferimento) è risultato pari a  $28,7 \mu\text{g/mL}$  ( $0,95 \times 30 + 0,16 = 28,66 \mu\text{g/mL}$ ). L'errore è risultato quindi essere di  $30 - 28,66 = 1,34$ , pari cioè a  $1,34/30 \times 100 = 4,5\%$ .

Per un Errore Totale ammissibile del 15%, scelto dalla letteratura scientifica considerando gli errori massimi riportati per farmaci simili, il nuovo metodo ARK consente di ottenere valori di levetiracetam entro la soglia di accettabilità. Questo fatto è facilmente comprensibile osservando il grafico MEDx mostrato in Figura 7, costruito utilizzando l'errore totale massimo ammissibile (TE<sub>max</sub>: 15%), l'imprecisione del nuovo metodo ARK (4,5%) e l'inesattezza (errore sistematico) stimata dall'analisi di regressione di Passing-Bablok (4,5%). Tale grafico mostra chiaramente che i dosaggi ARK automatizzati e il metodo HPLC sono effettivamente identici entro specifiche di qualità fissate a priori (TE<sub>max</sub>) (Figura 7).

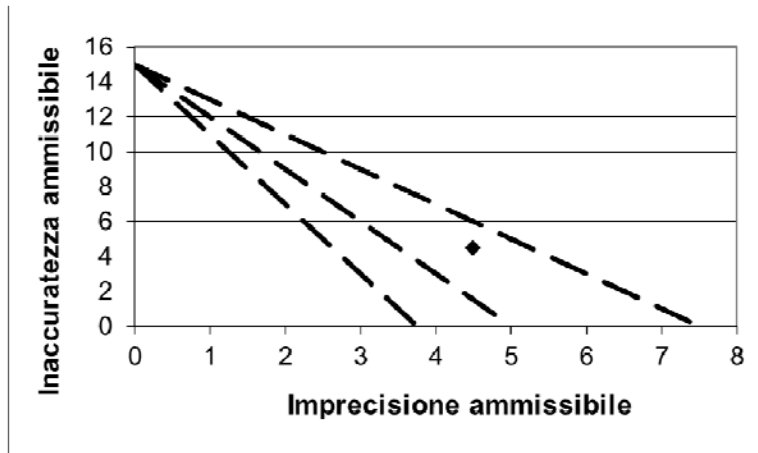


Figura 7: Grafico MEDx per valutare l'accettabilità basata su livelli di qualità stabiliti a priori (errore massimo totale ammissibile o  $TE_{max}$  pari al 15%).

Le 3 linee tratteggiate rappresentano tre diversi criteri attualmente accettati per l'Errore Totale. Le linee collegano  $TE_{max}$  sull'asse delle y con diversi punti dell'asse delle x, rispettivamente da destra a sinistra: 1)  $TE_{max}/2=7,5\%$  (corrispondente al criterio di errore totale  $TE_{max} = Inaccuratezza + 2 \cdot Imprecisione$ ); 2)  $TE_{max}/3=5\%$  (corrispondente al criterio di errore totale  $TE_{max} = Inaccuratezza + 3 \cdot Imprecisione$ ); 3)  $TE_{max}/4=3,75\%$  (corrispondente al criterio di errore totale  $TE_{max} = Inaccuratezza + 4 \cdot Imprecisione$ ). Le linee dividono il grafico in 4 zone, corrispondenti da sinistra a destra a prestazioni eccellenti, buone, marginali, scarse. Il punto rappresenta la coppia inesattezza-imprecisione del metodo ARK (calcolati sulla base dell'esperimento di imprecisione e dall'equazione di regressione di Passing-Bablok alla concentrazione di  $30 \mu\text{g/mL}$ ).

### 3.5 Valutazione dell'accettabilità basata su variabili qualitative

L'accordo tra i metodi è stato valutato anche dopo trasformazione dei livelli continui di concentrazione di levetiracetam in una variabile qualitativa dicotomica ( $<30$  e  $\geq 30 \mu\text{g/mL}$ ). L'accordo, calcolato come percentuale di coppie concordanti (%) e mediante K pesata di Cohen, era rispettivamente pari a 95% e  $k=0,89$  (95%IC 0,77-1,00).

In particolare, 21 dei 63 pazienti presentavano concentrazioni di levetiracetam al di fuori del range terapeutico secondo il metodo ARK e/o il metodo HPLC; per 18 di essi vi era accordo tra i due metodi, mentre per i restanti 3 pazienti la differenza è risultata inferiore a  $3 \mu\text{g/mL}$ .



#### 4. *Discussione*

In questo studio sono stati confrontati, tramite regressione non parametrica di Passing-Bablok, analisi di Bland-Altman e grafico MEDx, il metodo Bio-Rad HPLC, attualmente in uso, e l'immunodosaggio automatizzato ARK<sup>TM</sup> in prova.

Prima di procedere, tuttavia, le caratteristiche analitiche di precisione (ripetibilità totale o entro il laboratorio) e accuratezza, dichiarate dal produttore, sono state valutate al fine di verificare che i due strumenti lavorassero in accordo con le specifiche di qualità [18-19].

I dati mostrano chiaramente che i due metodi in uso e in prova sono sovrapponibili. Infatti, dall'analisi di regressione e dall'analisi di Bland-Altman è emerso unicamente un minimo errore sistematico.

Inoltre, lo studio evidenzia che i due metodi sono sostanzialmente identici entro l'imprecisione intrinseca, calcolata combinando le due imprecisioni totali, suggerendo che la maggior parte delle differenze osservate dipendono dalle imprecisioni dei due metodi.

Similmente, il grafico MEDx, costruito utilizzando un'imprecisione del 4,5% (ottenuta da dati sperimentali) e un'inaccuratezza del 4,5% (stimata alla concentrazione di 30 µg/mL dalla retta di regressione), ha evidenziato che i due metodi sono identici entro specifiche di qualità fissate a priori, suggerendo che i due metodi non differiscono per un errore maggiore dell'errore massimo ammissibile descritto in letteratura.

Un buon accordo è stato anche osservato con la K pesata di Cohen comparando la proporzione di pazienti con valori di levetiracetam superiori o inferiori a 30 µg/ml.

Altri esperimenti di comparazione tra metodo ARK e altri metodi sono descritti in letteratura. Tuttavia, questo studio presenta, rispetto ad altri, almeno tre tratti distintivi:

1. l'implementazione del metodo ARK su piattaforma analitica automatica CDx90
2. l'utilizzo di tecniche statistiche e strumenti grafici avanzati
3. la valutazione dell'accettabilità.

Infatti, questo è il primo studio in cui la combinazione metodo ARK e piattaforma CDx90 è stata valutata e confrontata con un metodo cromatografico per levetiracetam.

La piattaforma CDx90 è un sistema completamente automatizzato ad accesso casuale ad elevata velocità (90 test/ora), appositamente sviluppato per il monitoraggio terapeutico dei farmaci. L'implementazione su questa piattaforma automatizzata di metodi validati e

verificati può presentare teoricamente diversi vantaggi rispetto ai metodi cromatografici (HPLC o LC-MS/MS), tra cui tempi di analisi ridotti, semplificazione della fase preparativa del campione e riduzione dei costi, con potenziali benefici nella gestione delle risorse e del personale tecnico.

Tuttavia, occorre ricordare che la sostituzione di un metodo validato in uso con un nuovo metodo è un processo intensivo e complesso che deve essere attentamente pianificato per valutare correttamente sia l'accordo che l'accettabilità [9].

Nonostante in letteratura siano presenti molti studi di comparazione tra metodi analitici, la maggior parte di essi, come evidenziato da alcuni autori, sono stati condotti con metodi statistici non corretti [10-13]. Un esempio, a tale proposito, è rappresentato dal diffuso utilizzo del coefficiente di correlazione per la valutazione dell'accordo tra due metodi, secondo la diffusa, ed erronea, idea che un alto coefficiente di correlazione comporti automaticamente un buon accordo tra i due metodi investigati. Al contrario, il coefficiente di correlazione indica unicamente un'associazione tra i due metodi ma non necessariamente un accordo tra essi. Una seconda importante limitazione degli studi presenti in letteratura è rappresentata dal fatto che nella maggior parte di essi viene valutata unicamente la presenza di errore (proporzionale o costante) ma non l'accettabilità [20]. Al di là, invece, della presenza di un errore, anche significativo, è di primaria importanza valutare se il nuovo metodo in prova può sostituire il metodo in uso, consentendo uguali o migliori prestazioni analitiche, senza compromettere il significato e l'impatto clinico del dato prodotto.

In questo studio, al contrario, sono stati utilizzati due approcci principali per valutare l'accettabilità del metodo: l'accettabilità basata sull'imprecisione combinata e sull'errore massimo ammissibile suggerito in letteratura.

L'introduzione del metodo ARK nella nostra attività analitica di routine ha comportato notevoli vantaggi sia nell'ambito del laboratorio che clinico

Per introdurre il metodo immunologico ARK, in routine è necessario un addestramento meno intenso rispetto a quello richiesto per l'utilizzo dei metodi cromatografici (HPLC o LC-MS/MS); inoltre, esso consente di ridurre il carico di lavoro dei sistemi cromatografici, già pesantemente utilizzati per il monitoraggio di numerosi analiti.

Ancora più significativo è stato l'impatto del nuovo strumento/metodo in ambito clinico: prima dell'introduzione del metodo ARK su piattaforma CDx90, il dosaggio del levetiracetam era eseguito un'unica volta a settimana. L'esecuzione giornaliera del dosaggio ha consentito ai clinici:



- a) di verificare più frequentemente l'aderenza del paziente (compliance) al protocollo terapeutico;
- b) di monitorare con dosaggi ravvicinati specifici gruppi di pazienti, tra cui anziani, pazienti pediatrici e pazienti adulti con alterata funzione renale;
- c) non rimandare un dosaggio urgente (necessario ad esempio per i pazienti nell'Unità di Terapia Intensiva o del Pronto Soccorso).

A questo proposito, una revisione dei dati di laboratorio ha rivelato che la sostituzione del metodo cromatografico precedentemente in uso con il nuovo metodo ARK ha avuto un reale impatto positivo in termini di rapido raggiungimento del range terapeutico e quindi un migliore outcome nei pazienti ricoverati nell'Unità di Terapia Intensiva. Con il metodo precedente, la gestione ottimale del dosaggio e quindi il raggiungimento rapido del range terapeutico era ritardata a causa della cadenza settimanale del dosaggio. Infatti, un certo numero di pazienti mostravano concentrazioni di levetiracetam al limite inferiore o superiore, o anche al di fuori, del range terapeutico, per un periodo di tempo prolungato.

Di seguito vengono mostrati alcuni esempi:

- paziente A: 5,1 µg/mL (1° giorno), 6,6 (8° giorno), 3,6 (15° giorno): NON IN RANGE;
- paziente B: 3,8 µg/mL (1° giorno), 4,8 (8° giorno), 3,6 (15° giorno): NON IN RANGE;
- paziente C: 3,6µg/mL (1° giorno), 12,4 (8° giorno), 5,5 (15° giorno): AL LIMITE INFERIORE DEL RANGE.

Il nuovo metodo automatizzato ARK, eseguito giornalmente, consente ai clinici un aggiustamento frequente del dosaggio fino al raggiungimento rapido del range terapeutico del levetiracetam:

- paziente A: 50,0 µg/mL (1° giorno), 30,2 (6° giorno), 38,8 (9° giorno), 26,0 (10° giorno): IN RANGE;
- paziente B: 46.1 µg/mL (1° giorno), 31,2 (4° giorno), 26,0 (6° giorno), 26,4 (7° giorno): IN RANGE;
- paziente C: 33,8 µg/mL (1° giorno), 59,7 (3° giorno), 36,7 (6° giorno), 32,3 (10° giorno), 25,3 (17° giorno): IN RANGE.



## 5. Conclusioni

Il nuovo metodo ARK sulla piattaforma CDx90 è accettabile e può essere utilizzato in routine per il dosaggio del levetiracetam.

L'implementazione sulla piattaforma CDx90 permette tempi di risposta ridotti e una preparazione del campione semplificata, con conseguente potenziale miglioramento nella cura del paziente e nella gestione delle risorse del laboratorio.

### *Ringraziamenti e considerazioni finali*

Nel ringraziare Matteo Vidali, medico della SC Medicina Trasfusionale di Biella che ci ha aiutato nell'elaborazione statistica avanzata dei dati, vogliamo evidenziare come uno studio di questo tipo possa rappresentare un'occasione di formazione sul campo per i partecipanti al gruppo di lavoro.

Infatti l'attività svolta, peraltro accreditata E.C.M., ha permesso a tutti di sviluppare capacità gestionali e operative come la ricerca bibliografica, le tecniche statistiche e la capacità di scrivere un articolo scientifico. E' inoltre emerso che i risultati ottenuti da uno studio così progettato vanno al di là della ricerca e portano ad una migliore coesione e ad un maggior spirito di squadra tra tutti i partecipanti.



## Bibliografia

1. Crepeau AZ, Treiman DM. Levetiracetam: a comprehensive review. *Expert Rev Neurother.* 2010;10:159-171.
2. Johannessen SI, Tomson T. Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed? *Clin Pharmacokinet.* 2006;45:1061-1075.
3. Harden C. Safety profile of levetiracetam. *Epilepsia.* 2001;42:36-39.
4. Johannessen SI, Battino D, Berry DJ, et al. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit.* 2003;25:347-363.
5. Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43:707-724.
6. Tang PH, Miles MV. Rapid monitoring of levetiracetam in plasma and saliva by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 2005;27:255-6.
7. Martens-lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. *J Chromatogr B* 2005;10:197-200.
8. Corsaro C, Mangano MA, Signorelli A. Sviluppo e validazione di un metodo HPLC per il dosaggio del levetiracetam nel siero. *Bioc Clin* 2009;33:202-204
9. NCCLS. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document EP9-A2 [ISBN 1-56238-472-4].
10. Altman DG, Bland JM. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician* 1983;32:307-17
11. Mantha S, Roizen MF, Fleisher LA, et al. Comparing methods of clinical measurement: reporting standards for Bland and Altman analysis. *Anesth Analg.* 2000;90:593-602
12. Westgard JO, Hunt MR. Use and Interpretation of Common Statistical Tests in Method-Comparison Studies. *Clin Chem* 1973;19:49-57
13. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research* 1999;8:135-160
14. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the quality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression



- procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983;21:709–720.
15. Petersen PH, Stockl D, Blaabjerg O, Pedersen B, Birkemose E, Thienpont L, Flensted Lassen J, Kjeldsen J. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a Reference Method by use of difference plots. *Clin Chem* 1997;43:2039-46
  16. Westgard JO. A method evaluation decision chart (MEDx chart) for judging method performance. *Clin Lab Sci.* 1995;8:277-283.
  17. Reineks EZ, Lawson SE, Lembright KE, et al. Performance characteristics of a new levetiracetam immunoassay and method comparison with a high-performance liquid chromatography method. *Ther Drug Monit.* 2011;33:124-127.
  18. Chesher D. Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem Rev* 2008;29:S23-6
  19. NCCLS. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP15-A2 [ISBN 1-56238-574-7]
  20. Jensen AL, Kjølgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 2006;35:276-286
  21. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999;59:491-500.